

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Dominika Andrllová

Hemové senzorové proteiny detekující hem a zároveň CO

Heme sensor proteins sensing both heme and CO

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své skvělé školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za velkou ochotu, pomoc a pochopení při konzultaci bakalářské práce a také za její vlídná slova, která mi vždy dodala mnoho motivace.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 31. 5. 2020

.....

Abstrakt

Hem, komplex protoporfyrinu IX s iontem železa, je důležitou součástí mnoha proteinů, které jej využívají pro přenos, uskladnění a aktivaci kyslíku nebo pro přenos elektronů. Jinou skupinu hemových proteinů tvoří hemové sensorové proteiny. Ty jsou buď schopné detekovat hem, který svou interakcí přímo reguluje funkci proteinu (senzory hemu) a/nebo hem tvoří vazebné místo pro malé plynné molekuly (O_2 , CO a NO) a teprve tyto molekuly řídí funkci daných sensorů (senzory plynů). V případě některých konkrétních proteinů se však ukazuje, že je můžeme současně zařadit do obou těchto podskupin, neboť je jejich funkce regulována navázáním samotného hemu, a zároveň dochází k dalšímu pozměnění funkce po navázání molekuly plynu na hem. Tato souhrnná rešerše je zaměřená na konkrétní zástupce hemových sensorových proteinů (jejichž funkce je regulována navázáním hemu), v jejichž případě byl v poslední době zaznamenán vliv molekuly CO na jejich funkci. V práci jsou shrnuty nejdůležitější objevené poznatky o těchto hemoproteinech a na jejich příkladu je diskutováno, zda se v případě některých sensorů hemu jedná zároveň i o hemové senzory plynu detekující CO.

Klíčová slova: hem, hemové sensorové proteiny, hemové senzory plynu, CO senzory, senzory hemu, hemové redoxní senzory

Abstract

Heme, a protoporphyrin IX iron complex, is an important component of many proteins necessary for oxygen transfer, storage and activation, as well as for electron transfer. Another group of hemoproteins includes heme sensor proteins. They are either capable of detecting heme itself, which can regulate in turn the sensor function (heme-responsive sensors) or heme forms a binding site for small gas molecules (O₂, CO and NO) and the heme-based gas sensors are regulated by these diatomic gases. However, in the case of some proteins their classification is not clear showing a properties of both heme sensor proteins families. Their functions are regulated by heme interaction and a further change in their function after binding of a gas molecule to heme was observed. This summary search is focused on specific representatives of heme-responsive sensors (which function is regulated by heme binding), in which the further influence of the CO molecule on their functions have recently been observed. It is discussed whether some heme-responsive sensors are also heme-based CO sensors aiming the most recent findings about the selected specific heme sensors representatives.

Key words: heme, heme sensor proteins, heme-based gas sensors, CO sensors, heme-responsive sensors, heme redox sensors

Seznam zkratek

AF-2	část domény vázající ligand v jaderných receptorech, která je zodpovědná za navázání dalších transkripčních aktivátorů (z angl. activation function)
ARNT	jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků
ATP	adenosintrifosfát
bHLH	proteinová doména tvořená dvěma α -helixy propojenými smyčkou
BMAL1	transkripční faktor (z angl. brain and muscle Arnt-like 1)
CKACH	strukturní motiv Slo1 BK kanálu obsahující po sobě jdoucí aminokyseliny cystein, lysin, alanin, cystein, histidin
CLOCK	transkripční faktor účastnící se regulace cirkadiánních rytmtů
CP motiv	vazebný motiv složený z aminokyseliny cysteinu v sousedství prolinu
DBD	doména vázající DNA
DHR3	transkripční faktor <i>D. melanogaster</i> účastnící se regulace vývoje (z angl. Drosophila hormone receptor 3)
E75	jaderný receptor indukovaný ekdyzonem
EGFR	tyrosin-kinázový receptor epidermálního růstového faktoru
Fe²⁺ hem	komplex protoporfyrinu IX s iontem železa v redukovaném stavu
Fe³⁺ hem	komplex protoporfyrinu IX s iontem železa v oxidovaném stavu, někdy také hemin
HAT	doména s histonacetyltransferázovou aktivitou
HDAC3	histondeacetyláza 3
hemoCD1	komplex dimeru speciálního methylovaného derivátu cyklodextrinu a protoporfyrinu s Fe ²⁺ iontem
HO-1	hemoxygenáza 1
HO-2	hemoxygenáza 2
K_{ATP} kanály	draselné kanály, jejichž aktivita je závislá na intracelulární koncentraci ATP
LBD	doména vázající ligand
NADPH	redukovaný kofaktor nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NCoR1	korepresor jaderného receptoru 1
NPAS2	neuronální PAS doménový protein 2

PAS	doména nazývajících se podle tří proteinů obsahujících stejný strukturní motiv: protein kódovaný geny <i>period</i> <i>D. melanogaster</i> , jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků <u>AR</u> NT a produkt <i>single-minded</i> genů <i>D. melanogaster</i>
PAS-A	PAS doména proteinu NPAS2, která se vyskytuje první v pořadí
PGRMC1	membránový komponent progesteronového receptoru 1
RCK1	doména regulující vodivost K ⁺ kanálu 1
RCK2	doména regulující vodivost K ⁺ kanálu 2
Rev-erbα	savčí jaderný receptor regulující cirkadiánní rytmy, také známý jako NR1D1 (nukleární receptor podrodiny 1, skupiny D, člen 1)
Rev-erbβ	savčí jaderný receptor regulující cirkadiánní rytmy, také známý jako NR1D2 (nukleární receptor podrodiny 1, skupiny D, člen 2)
Slo1 BK kanály	Ca ²⁺ -aktivované a napětově řízené draselné kanály, jejichž název je odvozen od vysoké vodivosti a selektivity pro draselné ionty (BK, z angl. big potassium)

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Koordinační struktura hemu s navázaným Fe^{2+} a Fe^{3+} iontem železa	2
3. Vazba CO na hemové senzory plynu.....	4
4. Hemové senzorové proteiny	6
4. 1. Jaderný receptor E75.....	6
4. 2. Neuronální PAS doménový protein 2	7
4. 3. Transkripční faktor CLOCK	10
4. 4. Jaderné receptory Rev-erba a Rev-erb β	12
4. 5. Membránový komponent progesteronového receptoru 1	15
4. 6. Draselné kanály	18
5. Závěr	21
6. Seznam literatury	23

1. Úvod

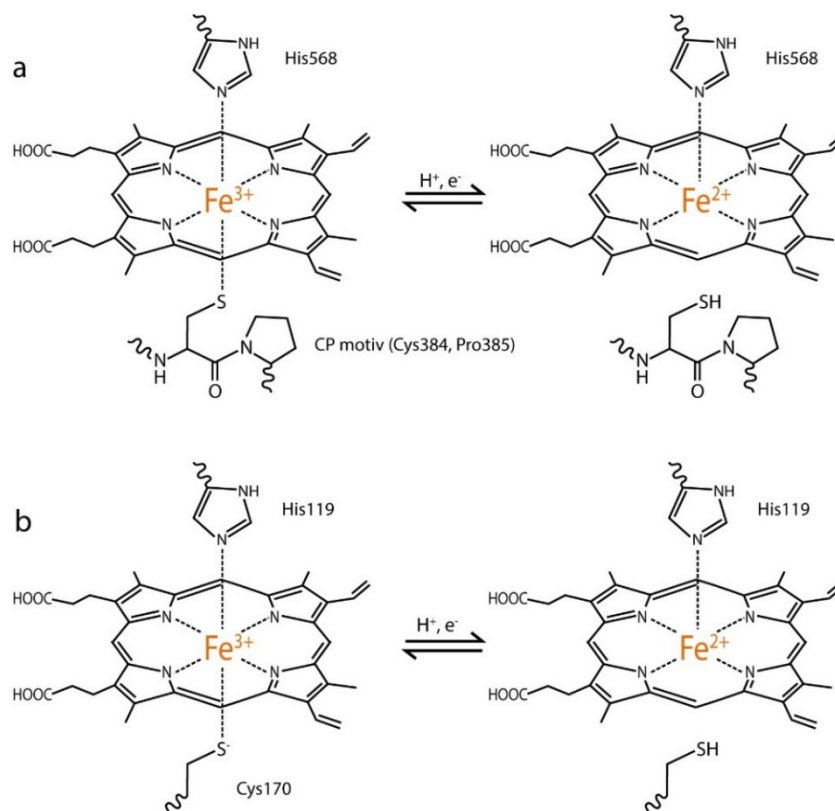
Jedním z prvků, který je pro organismy esenciální a nezbytně nutný pro správné fungování mnoha životních procesů, je železo. V živých organismech funguje jako kofaktor enzymů a vyskytuje se nejčastěji v podobě železnatého a železitého iontu, jako součást Fe-S klastrů nebo jako komponenta hemu. Hem, neboli komplex protoporphyrinu IX s navázaným iontem železa, je derivátem porfyrinu tvořený čtyřmi pyrrolovými kruhy, které svým atomem dusíku vážou koordinčně kovalentní vazbou ion železa. Hem se reverzibilně váže na řadu proteinů nebo je přímo jejich součástí a společně utváří tzv. hemové proteiny (nebo také hemoproteiny). Hemoproteiny se dále dělí do několika dalších skupin podle toho, jakou funkci zastává hem. Nejznámější skupinou jsou hemoproteiny, které slouží pro přenos O_2 (hemoglobin) a uskladnění O_2 (myoglobin). Dále je hem součástí několika druhů enzymů, například některých oxygenáz (cytochrom P450, NO syntáza) nebo peroxidáz. Hem je také součástí cytochromů (cytochrom *c*, cytochrom *b₅*), ve kterých slouží k přenosu elektronů.

V poslední době je však čím dál více pozornosti věnováno skupině hemových proteinů, které slouží jako senzory a jsou součástí signálních drah nejrůznějších buněčných procesů. Tyto hemové sensorové proteiny mohou být dvojího typu. Prvním typem jsou proteiny, které na sebe reverzibilně vážou hem a jeho navázání vede k pozměnění funkce daného proteinu (senzory hemu). Druhý typ proteinů ve své struktuře obsahuje hem, který slouží jako vazebné místo pro malé plynné molekuly (např. O_2 , CO či NO) a ke změně funkce proteinu dochází po jejich navázání. Tento typ hemových proteinů se nazývá hemové senzory plynu. V nedávné době některé studie naznačily, že tyto dvě podskupiny hemových sensorových proteinů by se pravděpodobně mohly částečně překrývat. Funkce některých proteinů je totiž regulována samotným navázáním hemu, ale pokud je poté na hem navázána molekula plynu, dochází následně k dalšímu pozměnění funkce proteinu. Tato zajímavá pozorování rozhodně stojí za bližší prozkoumání, a proto se v této práci zaměřím na takové hemové sensorové proteiny, jejichž aktivita je kromě samotného hemu ovlivněna také CO. Cílem je shrnout doposud objevené poznatky a diskutovat, zda je možnost, že by některé senzory hemu mohly být zároveň i CO senzory.

2. Koordinační struktura hemu s navázaným Fe^{2+} a Fe^{3+} iontem železa

Ion železa obsažený v hemu je schopen vytvořit celkem až 6 koordinačních vazeb. Čtyřmi z nich je vazba na atomy dusíku z protoporfyrinového kruhu. Pátým ligandem bývá aminokyselinový zbytek, který je vázán na ion železa pod rovinou protoporfyrinového kruhu (proximální vazebné místo) a slouží jako vazebné místo, díky kterému je hem napojen na zbytek proteinu. Posledním ligandem, jenž je vázán nad rovinou kruhu (distální vazebné místo), může být také aminokyselinový zbytek, nebo v případě hemových senzorů plynu molekula CO, NO či O_2 (Kajimura et al., 2010).

Hem může obsahovat buďto ion železa v redukovaném stavu a poté hovoříme o Fe^{2+} hemu nebo obsahuje oxidovanou formu iontu železa a jedná se o Fe^{3+} hem (někdy také hemin). Pokud v hemových sensorových proteinech dochází ke změně redoxního stavu iontu železa, která je doprovázena změnou struktury v okolí hemu, můžeme tyto proteiny označit jako hemové redoxní senzory.

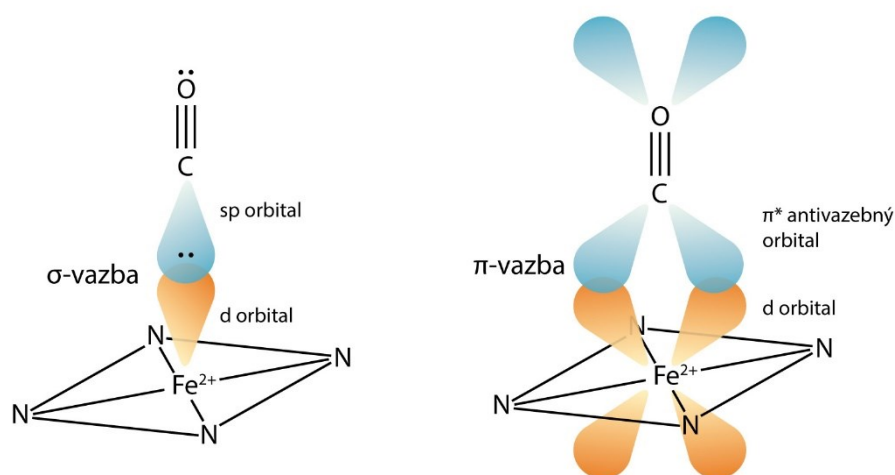


Obrázek 1: Koordinační struktura Fe^{3+} a Fe^{2+} hemu. (a) V případě Rev-erb β je oxidovaný Fe^{3+} hem vázán CP motivem (Cys384, Pro385) a His568. Po jeho redukcí CP motiv disociuje a zůstává navázán jen His568. (b) NPAS2 váže oxidovaný Fe^{3+} hem pomocí His119 a Cys170. Redukcí na Fe^{2+} hem dochází k disociaci Cys170. Převzato a upraveno podle (Shimizu et al., 2019).

Tato změna struktury, nejčastěji v podobě výměny ligandů interagujících s iontem železa hemu, může vést k pozměnění struktury celého proteinu, a tím pádem k regulaci jeho funkce. Příkladem je jaderný receptor regulující cirkadiánní rytmy Rev-erb β , také známý jako NR1D2 (nukleární receptor podrodiny 1, skupiny D, člen 2), jehož axiální ligandy vázající Fe³⁺ hem jsou Cys384 v sousedství Pro385 (tedy tzv. CP motiv) a His568 (Pardee et al., 2009). Pokud je však Fe³⁺ hem redukován na Fe²⁺ hem, dojde k disociaci thiolátu CP motivu a navázán zůstává pouze His568 (Obrázek 1a, str. 2) (Marvin et al., 2009). Dalším příkladem je neuronální PAS doménový protein 2 (NPAS2), jehož ligandem Fe³⁺ hemu je Cys170 a His119 a po redukcii na Fe²⁺ hem dochází k disociaci Cys170 (Obrázek 1b, str. 2) a bylo pozorováno, že jeho místo posléze zaujme His171 (Uchida et al., 2005).

3. Vazba CO na hemové senzory plynu

V organismech přirozeně vzniká malé množství oxidu uhelnatého při procesech degradace hemu. Molekula CO je uvolněna při oxidaci hemu na biliverdin katalyzované enzymem hemoxygenázou (Tenhunen et al., 1969). Tato molekula je charakterizována vysokou stabilitou, kterou zajišťuje trojná vazba mezi atomy kyslíku a uhlíku. I přes svou nízkou reaktivitu tvoří CO koordinačně kovalentní vazbu s kovovými komplexy. Například právě koordinační vazba na železnatý ion hemu je hlavní podstatou fungování signalizace pomocí CO v hemových sensorových proteinech, které detekují plyny (Rochette et al., 2013). Tato vazba je realizována s přispěním několika typů orbitalů. Jedním z nich je sp hybridizovaný orbital CO obsahující elektronový pár, který je sdílen s d orbitalem Fe^{2+} , a vytváří tak σ -vazbu. Z d orbitalu Fe^{2+} jsou nazpět poskytovány elektrony do π^* antivazebného molekulového orbitalu CO vytvářející π -vazbu. Díky prostorové orientaci sp orbitalu oxidu uhelnatého je molekula na ion železa vázána v lineární podobě kolmé na rovinu protoporfyrinového kruhu (Obrázek 2) (Fukuto et al., 2012).



Obrázek 2: Struktura vazby CO na Fe^{2+} hem. CO sdílí volný elektronový pár s d orbitalem železnatého iontu a utváří tak σ -vazbu. Elektrony z d orbitalů Fe^{2+} jsou nazpět poskytnuty π^* antivazebnému molekulovému orbitalu CO a tím vytváří π -vazbu. Převzato a upraveno podle (Fukuto et al., 2012).

Důležité je, že molekula CO se váže pouze na redukovanou formu iontu železa hemu, tj. na hem obsahující Fe^{2+} ion, zatímco na Fe^{3+} hem se neváže. Důvodem je rozdíl v počtu elektronů iontů železa. Ion Fe^{2+} , který má oproti Fe^{3+} jeden elektron navíc, je schopen zpětného poskytnutí elektronů z d orbitalu do π^* antivazebného molekulového orbitalu CO a vzniká tak

mezi nimi π -vazba. Naopak elektronově chudší Fe^{3+} není schopen tuto π -vazbu utvořit, a tak je navázání CO na Fe^{3+} hem znemožněno (Kajimura et al., 2010). Oproti tomu molekula NO je schopna vazby jak na Fe^{2+} hem, tak i na Fe^{3+} hem (Addison and Stephanos, 1986). NO může reagovat i s dalšími molekulami, například s aminokyselinou cysteinem skrze thiolovou skupinu, a tím ovlivňovat funkci různých proteinů (Hess et al., 2005). V případě oxidu uhelnatého žádné další interakce s jinými molekulami, než je Fe^{2+} hem, pozorovány nebyly (až na jedinou výjimku, viz kapitola 4.6 Draselné kanály).

Jak bylo výše popsáno, v hemových sensorových proteinech může dojít k redukci Fe^{3+} hemu na Fe^{2+} hem, a tím dochází k pozměnění koordinační struktury, a někdy dokonce až k výměně ligandů. Zároveň redukce železitého iontu na železnatý ion umožní, že se na hem bude moci vázat i molekula CO, která se předtím na Fe^{3+} hem navázat nemohla. V případě zmíněného NPAS2 bylo zjištěno, že pokud je v Fe^{2+} hemu navázaný histidin nahrazen molekulou CO, dojde k narušení vodíkové vazby His171 s okolními aminokyselinovými zbytky, čímž dojde ke konformačním změnám v dalších doménách proteinu, a tím k pozměnění jeho funkce (Uchida et al., 2005). Pokud je molekula CO schopná svým navázáním ovlivnit funkci NPAS2, nabízí se otázka, zda by některé hemové sensorové proteiny, u kterých se v důsledku změny redoxního stavu iontu železa hemu mění struktura, mohly být zároveň i CO senzory. Otázkou zůstává, jakými mechanismy dochází k redukci Fe^{3+} hemu na Fe^{2+} hem, aby se mohla molekula CO na hem navázat. V následujících kapitolách se zaměřím na konkrétní zástupce hemových sensorových proteinů, u kterých budu diskutovat, zda je možné, aby zároveň sloužily jako senzory hemu a senzory CO, s ohledem na to, že jejich funkce může být regulována i samotnou změnou oxidačního stavu iontu železa při redukci Fe^{3+} hemu na Fe^{2+} hem.

4. Hemové senzorové proteiny

4. 1. Jaderný receptor E75

E75 je jaderný receptor *Drosophila melanogaster*, který funguje jako transkripční faktor. Je kódovaný geny *E75*, které exprimují tři typy proteinů, E75A, E75B a E75C, lišící se strukturou N-terminální domény vázající DNA (DBD, z angl. DNA binding domain). Tato doména obsahuje dvakrát motiv zinkového prstu, díky kterému se protein váže na DNA. E75B obsahuje pouze jeden z motivů zinkového prstu, a proto vazby na DNA není schopen (Segraves and Hogness, 1990). Exprese *E75* je indukována hormonem ekdyzonem, který má na starosti správný průběh larválního vývoje a metamorfózy *D. melanogaster* (Buszczak et al., 1999). Mimo DBD obsahuje E75 také doménu, která váže ligand (LBD, ligand binding domain) obsahující Fe^{3+} hem, který se ukázal být důležitou součástí proteinu zajišťující jeho stabilitu, jelikož množství exprimovaného E75 vykazuje závislost na koncentraci dostupného hemu (Reinking et al., 2005). Studie struktury LBD ukázaly, že pravděpodobnými ligandy interagujícími s Fe^{3+} hemem by mohly být His364 a His547 (Reinking et al., 2005). Později bylo objeveno, že LBD obsahuje hem typu b s 6 koordinovanými ligandy, z nichž byl potvrzen His547 a dále byly navrženy jako pravděpodobné ligandy Cys396 a Cys468 (de Rosny et al., 2006). Do budoucna bude potřeba dalších studií, které lépe odhalí přesnou strukturu okolí Fe^{3+} hemu v LBD doméně E75.

Druhým ekdyzonem indukovaným transkripčním faktorem, který hraje roli ve správném vývoji *D. melanogaster*, je DHR3 (z angl. *Drosophila* hormone receptor 3). E75B, jehož odlišná struktura DBD mu znemožňuje vazbu na DNA, je schopný vázat transkripční faktor DHR3 a inhibuje tím jeho schopnost indukce exprese jaderného receptoru $\beta\text{FTZ-F1}$ (White et al., 1997). Součástí LBD domény DHR3 proteinu je doména, jejíž aktivita je závislá na navázání ligandu, a která je zodpovědná za navázání dalších transkripčních aktivátorů (AF-2, z angl. activation function). Důkaz vazby E75 a DHR3 byl proveden vytvořením analogu AF-2 domény proteinu DHR3, jejíž navázání na E75 vedlo k termostabilizaci proteinu. Avšak je nutné zmínit, že toto zvýšení termostability bylo pozorováno pouze v případě E75, který měl navázaný redukovaný Fe^{2+} hem, vedoucí k myšlence, že E75 by mohl být hemovým redoxním senzorem. (Reinking et al., 2005).

Redukovaný Fe^{2+} hem může zároveň sloužit jako vazebné místo pro molekulu CO. Aby se mohl CO na Fe^{2+} hem navázat, musí dojít k jeho výměně za jeden z axiálních ligandů (v tomto případě za cystein). Navázáním oxidu uhelnatého dojde ke změně koordinační struktury hemu. Tato změna bývá navíc často odlišná od pouhé strukturní změny vyvolané předchozím redoxním posunem z oxidované formy iontu hemu na jeho redukovanou formu (Marvin et al., 2009). Interakce molekul CO a NO s E75 byla potvrzená spektrofotometrickými metodami. Také byl prokázán nárůst termostability E75 po přidání CO. Pokud se však dodatečně přidala ještě doména AF-2 proteinu DHR3, další nárůst termostability pozorován nebyl. Pravděpodobně tedy vazba CO na Fe^{2+} hem E75 vede k znemožnění vazby E75 na DHR3, a tím k zabránění jeho represní funkce. Vliv na transkripční aktivitu však nebyl testován. (Reinking et al., 2005). Na základě tohoto zjištění je možné zvažovat, že E75 je hemovým senzorem plynu detekující CO.

4. 2. Neuronální PAS doménový protein 2

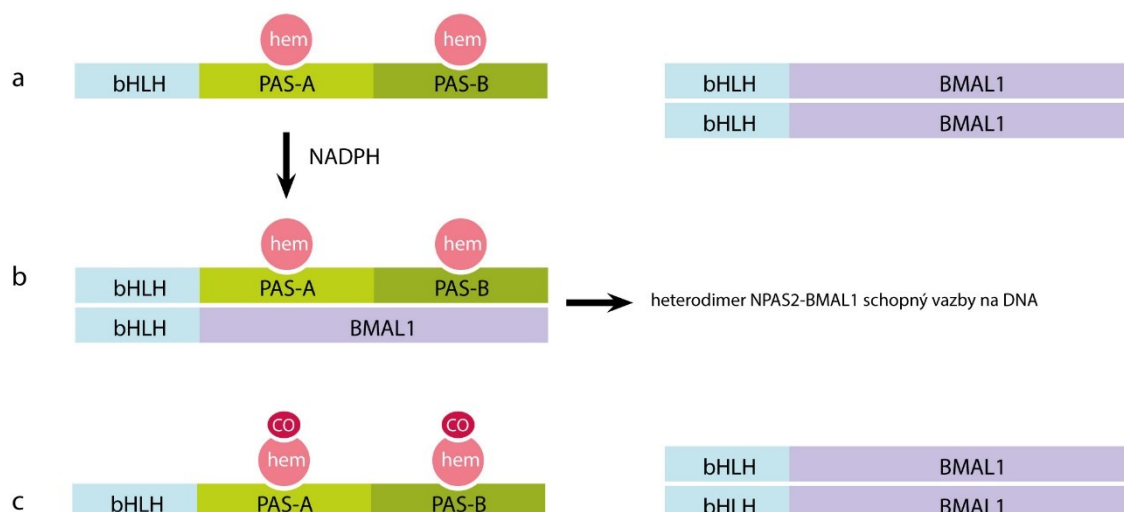
NPAS2, neboli neuronální PAS doménový protein 2, je savčím transkripčním faktorem, který se účastní regulace cirkadiánních rytmů. Sekvenčně je NPAS2 velmi podobný transkripčnímu faktoru CLOCK (King et al., 1997), který se také podílí na regulaci cirkadiánních rytmů a sdílí s ním stejnou funkci. Oba proteiny jsou schopny tvořit heterodimer s transkripčním faktorem BMAL1 (z angl. brain and muscle Arnt-like 1), díky kterému se mohou vázat na DNA a regulovat transkripci (Dioum et al., 2002). Konkrétně se heterodimer NPAS2-BMAL1 váže do „enhancerové“ sekvence promotorů *per* a *cry* genů a aktivuje jejich transkripci. Výsledné produkty těchto genů slouží jako negativní regulátory cirkadiánních rytmů (Uchida et al., 2005).

NPAS2 obsahuje speciální doménu tvořenou dvěma α -helixy propojenými smyčkou (bHLH, z angl. basic helix-loop-helix). Dále je struktura NPAS2 tvořena dvěma PAS doménami, PAS-A a PAS-B, které vážou hem (Dioum et al., 2002). PAS doména je nazvána podle tří proteinů obsahující stejný strukturní motiv: protein kódovaný geny *period* *D. melanogaster*, jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků *ARNT* a produkt *single-minded* genů *D. melanogaster* (Zhou et al., 1997). Studie, které byly věnovány přímo samotné PAS-A doméně, ukázaly, že asociační konstanta pro vazbu hemu na PAS-A doménu s připojenou bHLH doménou (bHLH-PAS-A) je vyšší, než pro vazbu hemu

na samostatnou PAS-A. Pravděpodobně tedy bHLH doména hraje roli ve schopnosti hemu navázat se na PAS-A doménu (Mukaiyama et al., 2006). Zároveň bylo pozorováno, že vazba bHLH-PAS-A na DNA byla možná jen v případě, že byl na PAS-A doméně navázán hem, v jeho nepřítomnosti se bHLH-PAS-A na DNA nevázala (Mukaiyama et al., 2006). Později byla provedena studie, jejíž výsledky byly zcela v rozporu s předchozím tvrzením. Ukázalo se, že přidání hemu k bHLH-PAS-A doméně vazbu na DNA naopak inhibuje (Freeman et al., 2019). Zůstává nadále otázkou, jakým způsobem hem ovlivňuje vazbu bHLH-PAS-A domény na DNA, a jestli je transkripční faktor NPAS2 schopný detekovat změny v koncentraci hemu a patří tak do skupiny hemových senzorů. Jak bude diskutováno níže, je pravděpodobně důležité, v jakých oxidačně-redukčních podmínkách jsou experimenty s hemem provedeny. Tedy konkrétně, zda ion železa hemu je oxidován (Fe^{3+}) nebo redukován (Fe^{2+}), případně také na tom, zda jsou v prostředí další signální molekuly, jako např. CO.

Protein NPAS2 funguje jako transkripční faktor s navázanými hemy na PAS doménách, ale zároveň bylo prokázáno, že tuto funkci plní i bez navázaných hemů (Dioum et al., 2002). V obou případech je však nutné, aby NPAS2 vytvořil heterodimer s BMAL1, jinak není schopný vazby na DNA a regulace transkripce. Zároveň bylo pozorováno, že tato vazba NPAS2-BMAL1 na DNA vyžaduje přítomnost redukovaného kofaktoru nikotinamidadeninindukleotidfosfátu (NADPH) (Obrázek 3b, str. 9). Pokud je NADPH nedostatek, nedochází k vytvoření heterodimeru NPAS2-BMAL1 a vzniká jen homodimér BMAL1-BMAL1 (Obrázek 3a, str. 9), který sám o sobě transkripci aktivovat nedokáže. (Dioum et al., 2002).

Hem s Fe^{3+} iontem je na PAS doménu koordinačně vázán ligandy His119 a Cys170. Pokud dojde k redukcí iontu železa v hemu ze stavu Fe^{3+} na Fe^{2+} , Cys170 disociuje a jeho místo nahradí His171 (Uchida et al., 2005). Na hem s redukováným iontem železa je také nyní umožněna vazba molekuly CO. Hem je však v tomto stavu vázán 6 ligandy, a proto může být vazba CO realizována pouze v případě výměny CO za jeden z histidinů. Zatím však není zcela jasné, který z histidinů je nahrazen. Jednou z možností je nahrazení His171, které může v PAS-A doméně vyvolat strukturní změny natolik velké, že dojde k ovlivnění funkce celého proteinu. V druhém případě může molekula CO nahradit His119, a tím narušit vodíkový můstek mezi His171 a Cys170 (Uchida et al., 2005). Skupina Uchida a kol. se dále zabývala porovnáním sekvence NPAS2 s dalšími proteiny obsahující PAS domény (FixL, *Ec* DOS) a na základě sekvenčních podobností se kloní k názoru, že nahrazen je spíše His171. Nicméně bude potřeba dalších studií, které by toto tvrzení potvrdily či vyvrátily.



Obrázek 3: Schéma interakce NPAS2 s BMAL1 v přítomnosti NADPH a CO. (a) V nepřítomnosti NADPH je tvořen homodimér BMAL1-BMAL1. **(b)** Přidáním NADPH se vytvoří heterodimer NPAS2-BMAL1, který je schopný vazby na DNA. **(c)** CO zabraňuje v tvorbě heterodimeru NPAS2-BMAL1, a tím i jeho vazbě na DNA. Převzato a upraveno podle (Uchida et al., 2005).

Koordinační struktura Fe^{2+} a Fe^{3+} hemu v NPAS2 byla dále studována provedením mutací jednotlivých axiálních ligandů iontů železa a následným pozorováním změn transkripční aktivity *per* genů. Zatímco mutace Cys170 nevedla k žádným změnám, u mutací His119 a His171 došlo ke snížení transkripční aktivity. Důvodem bylo zabránění formace NPAS2-BMAL1 heterodimeru, a tím znemožnění vazby na DNA (Ishida et al., 2008). Mutace His119 a His171, které jsou ligandy Fe^{2+} hemu, vedly ke snížení transkripce a naopak mutace Cys170, který je ligandem Fe^{3+} hemu, transkripční aktivitu neovlivnila. Z těchto informací vyplývá, že Fe^{2+} hem nebo jeho okolní koordinační struktura je důležitá pro správnou funkci NPAS2 vzhledem k tvorbě heterodimerů s BMAL1, zatímco u formy obsahující Fe^{3+} hem tomu tak není.

Zajímavé je zjištění, že přidání CO k NPAS2 s navázaným Fe^{2+} hemem naruší vazbu NPAS2 na DNA. Znamená to, že CO pravděpodobně zabraňuje formaci heterodimeru NPAS2-BMAL1 (Obrázek 3c), bez jehož vzniku není možná vazba NPAS2 na DNA (Dioum et al., 2002). Tento fakt napovídá, že i transkripční faktor NPAS2 by mohl být hemovým senzorem plynu, ve kterém je funkce regulace cirkadiánních rytmů ovlivněna molekulou CO. Jelikož se CO váže pouze na Fe^{2+} hem, je nutné se ptát, jakým způsobem dochází k redukci Fe^{2+} iontu na Fe^{3+} ion. Bylo prokázáno, že redukce iontu železa v proteinech obsahujících hem je za anaerobních podmínek a v přítomnosti peroxidu jako donoru elektronů stimulována oxidem uhelnatým (Sher et al., 2012). V případě NPAS2 připadá v úvahu, že redukce

Fe^{3+} hemu je stimulována právě pomocí CO a donorem elektronů by mohl být NADPH, ale zatím nebylo prokázáno, že tomu tak opravdu je, a proto stále zůstává otázka, jestli je či není NPAS2 hemovým senzorem plynu.

4. 3. Transkripční faktor CLOCK

Dalším savčím transkripčním faktorem ovlivňujícím správné fungování cirkadiálních rytmtů je protein CLOCK. Jak již bylo výše zmíněno, CLOCK je sekvencí velmi podobný transkripčnímu faktoru NPAS2 a obsahuje také stejné domény, tj. bHLH doménu a dvě PAS domény vázající hem (King et al., 1997). Mimo strukturu sdílí CLOCK a NPAS2 i stejnou funkci. Oba proteiny jsou schopné utvářet heterodimer s proteinem BMAL1 a v této formě se vážou na DNA a aktivují expresi *per* a *cry* genů (Asher and Schibler, 2006). CLOCK navíc obsahuje doménu s histonacetyltransferázovou aktivitou (HAT), která acetyluje H3 a H4 histony na DNA. K aktivaci této domény dochází navázáním BMAL1 na CLOCK. Mutace v HAT doméně vede ke snížení exprese *per* a *cry* genů. HAT doména proto hraje důležitou roli v aktivaci exprese *per* a *cry* genů zprostředkované vazbou heterodimeru CLOCK-BMAL1 na DNA (Doi et al., 2006).

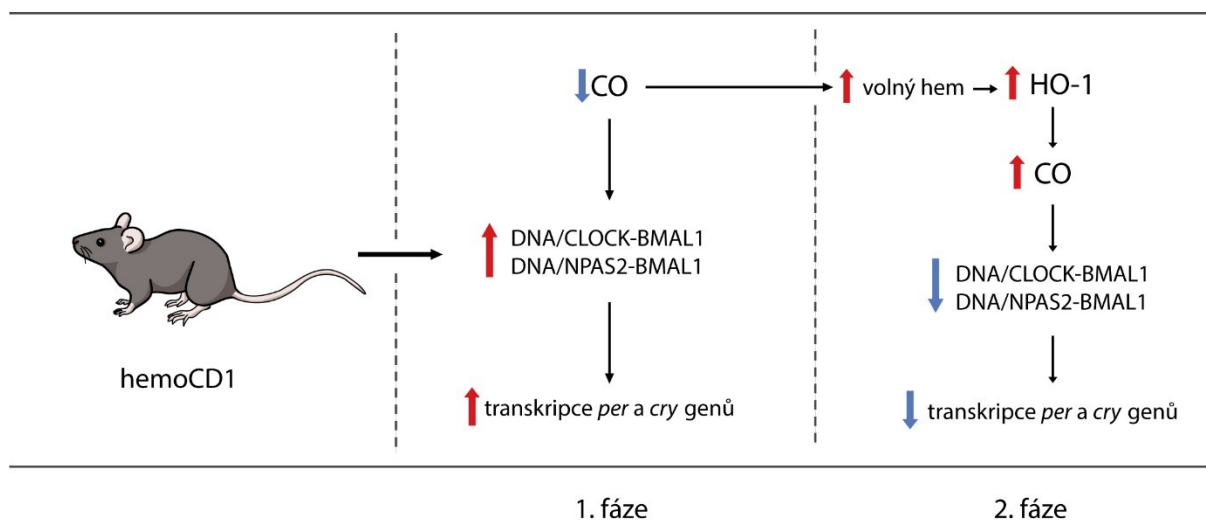
Studii izolované PAS-A domény se však ukázalo, že i přes sekvenční podobnost CLOCK s NPAS2, je jejich koordinační struktura Fe^{3+} hemu v PAS-A doméně rozdílná. Zatímco v NPAS2 jsou axiálními ligandy Fe^{3+} hemu His119 a Cys170 (Uchida et al., 2005), v případě transkripčního faktoru CLOCK je tomu pravděpodobně jinak. V PAS-A doméně proteinu CLOCK byl Ramanovou rezonanční spektroskopií identifikován 6-koordinovaný nízkospinový ion železa hemu. Porovnáním s ostatními hemovými proteiny, které také obsahují 6-koordinovaný nízkospinový ion železa hemu, bylo naměřené spektrum nejvíce podobné spektru cytochromu *b₅*, hemopexinu či neuroglobinu. Axiálními ligandy Fe^{3+} hemu těchto proteinů jsou histidiny a je tedy možné, že Fe^{3+} hem v PAS-A doméně proteinu CLOCK je vázán také dvěma histidiny (Lukat-Rodgers et al., 2010). V další studii byl na základě modelování struktury PAS-A domény proteinu CLOCK navržen jako axiální ligand Fe^{3+} hemu His144. Spektroskopické studie PAS-A domény s mutovaným His144 později potvrdily, že His144 je opravdu axiálním ligandem Fe^{3+} hemu. Také bylo znovu prověřováno, zda druhým axiálním ligandem nemůže být cystein, jako je tomu v případě NPAS2, ale k vazbě cysteinu na Fe^{3+} hem PAS-A domény proteinu CLOCK docházelo pouze za velmi nízkých teplot. Proto

byl cystein jako axiální ligand hemu zavrhnut (Freeman et al., 2019). Koordinační struktura Fe^{2+} hemu nebyla prozatím příliš podrobně studována. Výsledky Ramanovy rezonanční spektroskopie pouze odhalily, že se jedná o směs 5-koordinovaného vysokospinového a 6-koordinovaného nízkospinového stavu iontu železa hemu (Lukat-Rodgers et al., 2010).

Dále bylo zkoumáno, jestli navázání hemu na bHLH-PAS-A doménu proteinu CLOCK ovlivňuje schopnost vazby této domény na DNA, a tím ovlivnění exprese *per* a *cry* genů. Stejně jako v případě transkripčního faktoru NPAS2 se ukázalo, že přítomnost hemu znemožnila vazbu bHLH-PAS-A domény na DNA (Freeman et al., 2019). Navázání hemu zřejmě působí tak výrazné změny ve struktuře, které vedou k nemožnosti vazby bHLH-PAS-A domény na DNA. Na základě tohoto zjištění můžeme transkripční faktor CLOCK zařadit také mezi hemové senzorové proteiny schopné detekovat přítomnost hemu.

Stejně jako v případě jiných proteinů vázajících hem je otázkou, jestli by na funkci transkripčního faktoru CLOCK mohl mít vliv oxid uhelnatý. Interakce CO s Fe^{2+} hemem proteinu CLOCK byla *in vitro* prokázána spektroskopickými metodami (Lukat-Rodgers et al., 2010). Je však nutné zdůraznit, že v tomto případě byl železitý ion hemu redukován na železnatý ion pomocí $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, a tak stále zůstává otázka, jakým způsobem dochází k redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} v živých organismech, aby mohla být umožněna vazba CO na hem. Vliv molekuly CO na cirkadiánní rytmy byl v posledních letech pozorován v rámci studia některých patologických procesů. Například při subarachnoidálním krvácení v mozku myši dochází k narušení cirkadiánních rytmů. CO se podílí na zpětné obnově správného fungování cirkadiánních rytmů, a dokonce má vliv i na snížení neuronálního poškození způsobeného krvácením (Schallner et al., 2017). Také bylo prokázáno, že CO hraje roli skrze ovlivňování cirkadiánních rytmů v ochraně proti poškození ledvin po transplantaci, při které hrozí poškození ischemických tkání po obnově krevního toku (Correa-Costa et al., 2018).

Některé studie, které se zabývaly vlivem CO na cirkadiánní rytmy, zahrnovaly mutace enzymu hemoxygenázy 1 (HO-1) (Schallner et al., 2017). HO-1 se účastní degradace hemu, při které je zapotřebí NADPH a zároveň při tomto procesu vzniká molekula CO. Jak bylo diskutováno výše, samotný hem i NADPH mají vliv na vazbu transkripčních faktorů CLOCK i NPAS2 na DNA. Aby bylo možné posoudit čistě jen samotný vliv CO na cirkadiánní rytmy, byla provedena studie na myších, při které byl endogenní CO selektivně vychytáván uměle vytvořeným komplexem dimeru speciálního methylovaného derivátu cyklodextrinu a protoporfyrinu s Fe^{2+} iontem (hemoCD1).



Obrázek 4: Mechanismus ovlivnění cirkadiánních rytmů vychytáváním endogenního CO pomocí komplexu hemoCD1. Odstranění CO vede k vazbě heterodimeru CLOCK/NPAS2-BMAL1 na DNA a tím ke zvýšení transkripce *per* a *cry* genů. Po delší době nedostatku CO byl pozorován nárůst koncentrace volného hemu, jehož degradací pomocí HO-1 dochází ke zvýšení hladiny CO, které má za následek snížení transkripce *per* a *cry* genů. Převzato a upraveno podle (Minegishi et al., 2018).

V první fázi po selektivním odstranění CO byla pozorována zvýšená tvorba CLOCK/NPAS2-BMAL1 heterodimeru, který se navázal na DNA a tím zvýšil expresi *per* a *cry* genů. Po několika hodinách nastoupila druhá fáze, ve které se v důsledku odstraněného CO začala zvyšovat hladina volného hemu. Nutnost degradace volného hemu vedla ke zvýšení aktivity HO-1 a tím zároveň ke zvýšené produkci CO. Nárůst koncentrace CO způsobil narušení vazby mezi CLOCK/NPAS2 a BMAL1 a nemožnost utvořit heterodimer, který se váže na DNA a aktivuje transkripci, vedla ke snížení exprese *per* a *cry* genů. Tento stav trval ještě několik dalších hodin, než se koncentrace CO snížila zpět na normální hodnoty (Obrázek 4) (Minegishi et al., 2018). Toto pozorování je důkazem, že CO má vliv na cirkadiánní rytmy a můžeme díky tomu CLOCK i NPAS2 zařadit mezi hemové senzory plynu, jejichž funkce je regulována molekulou CO.

4. 4. Jaderné receptory Rev-erba a Rev-erbβ

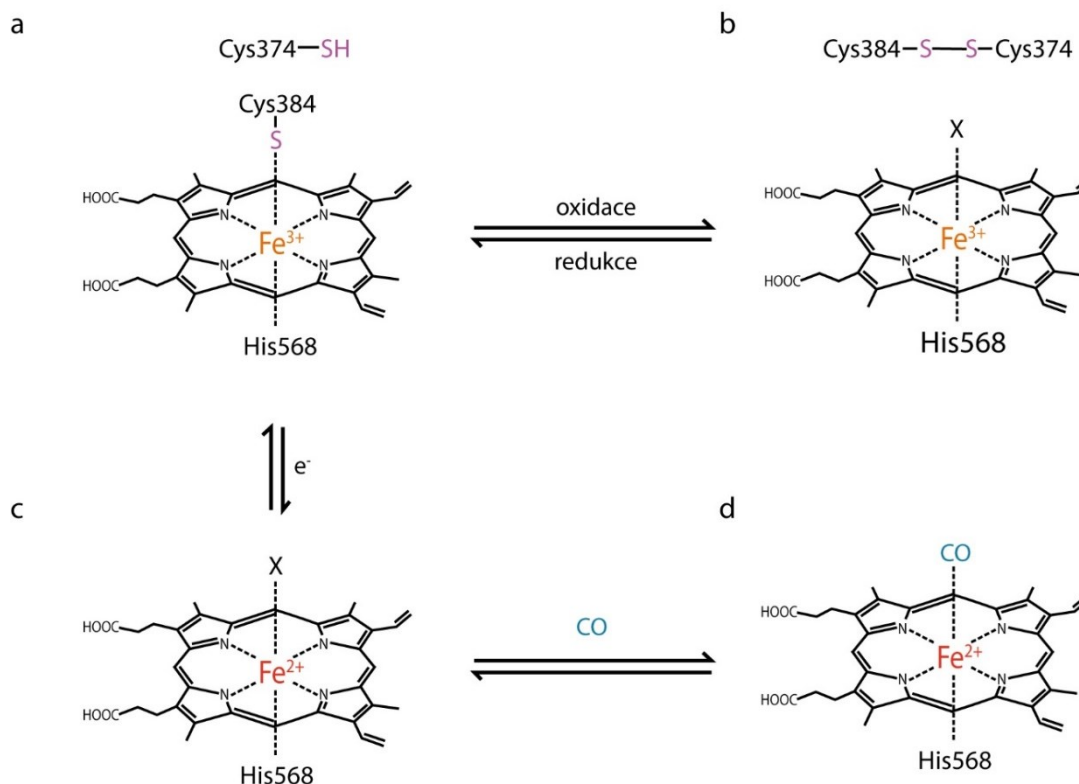
V předchozích kapitolách byla diskutována možnost zařazení transkripčních faktorů NPAS2 a CLOCK do skupiny hemových sensorových proteinů detekujících CO. Dalšími savčími transkripčními faktory, které regulují správný chod cirkadiánních rytmů a jejichž role

je úzce spojená s transkripčními faktory NPAS2 a CLOCK, jsou jaderné receptory Rev-erba (nebo také NR1D1, nukleární receptor podrodiny 1, skupiny D, člen 1) a Rev-erbβ. Hlavní funkcí těchto proteinů je represe transkripce genů *Bmal1*, jejichž produktem je protein BMAL1, který je esenciální pro vazbu NPAS2 a CLOCK na DNA. Mimo gen *Bmal1* také Rev-erba a Rev-erbβ zabraňují transkripci genu *clock* (Preitner et al., 2002). Represe transkripce je realizována za pomoci korepresoru jaderného receptoru NCoR1 (z angl. nuclear receptor corepressor 1), který se váže na Rev-erba (Zamir et al., 1997). NCoR1 zprostředkovává vazbu na histondeacetylázu 3 (HDAC3), která deacetylací histonů zajistí přeměnu přístupného rozvolněného euchromatinu na vysoce kondenzovaný nepřístupný heterochromatin, a tím znemožní zahájení transkripce *Bmal1* a *clock* genů (Aranda and Pascual, 2001). Krom cirkadiálních rytmtů se Rev-erba a Rev-erbβ také účastní regulace metabolismu sacharidů (Yin et al., 2007).

Stejně jako jaderný receptor E75 obsahují Rev-erba a Rev-erbβ vysoce konzervovanou DBD doménu na N-konci proteinu a variabilnější LBD doménu na C-konci. LBD doména většiny jaderných receptorů v sobě obsahuje AF-2 doménu, která je zodpovědná za interakci s dalšími transkripčními faktory aktivující transkripci příslušných genů (Bain et al., 2007). V případě Rev-erba a Rev-erbβ AF-2 doména chybí (Renaud et al., 2000). Bylo pozorováno, že LBD doména je schopna interagovat s Fe^{3+} hemem, jehož navázání vede k termostabilizaci LBD domény. Jako axiální ligand Fe^{3+} hemu v Rev-erba byl potvrzen His602, druhý axiální ligand prozatím identifikován nebyl (Raghuram et al., 2007). Mutace His602 vyústila v narušení interakce Rev-erba s NCoR1 a HDAC3. Také odstranění hemu *in vivo* z HeLa buněk vedlo k výraznému snížení tvorby komplexů Rev-erba s NCoR1-HDAC3, které způsobilo zvýšenou expresi *Bmal1* genu (Yin et al., 2007). Z této studie vyplývá, že přítomnost Fe^{3+} hemu a jeho navázání na Rev-erba má zásadní vliv na regulaci funkce tohoto proteinu.

V jaderném receptoru Rev-erbβ je Fe^{3+} hem vázán pomocí His568 a Cys 384 (ten je součástí CP motivu tvořeného Cys384 a Pro385) (Obrázek 5a, str. 14) (Pardee et al., 2009). V případě Rev-erba bylo *in vivo* v HeLa buňkách prokázáno, že navázání Fe^{3+} hemu způsobí takové konformační změny, které vedou ke zvýšení afinity jaderného receptoru Rev-erba k NCoR1 (Yin et al., 2007). Naproti tomu strukturní studie Rev-erbβ *in vitro* ukázaly, že navázání Fe^{3+} hemu vede naopak ke snížení afinity proteinu k NCoR1 (Pardee et al., 2009). Je nutné zdůraznit, že při studiu *in vitro* není možné dosáhnout stejných podmínek jako v živých buňkách, a to je možným důvodem pro vznik takto rozporuplných výsledků. Pozdější studie

ukázaly, že navázání Fe^{3+} hemu na Rev-erb β vede ke zvýšení afinity k NCoR1, ale tato regulace je pravděpodobně řízena nepřímo skrze jiné buněčné komponenty související s degradací proteinů pomocí ubiquitinace v proteazomu (Carter et al., 2016).



Obrázek 5: Změna koordinační struktury hemu v závislosti na redoxním stavu iontu železa hemu a celého proteinu Rev-erb β . (a) Fe^{3+} hem je v Rev-erb β vázán pomocí His568 a Cys384. (b) Pokud dojde k oxidaci, utvoří se mezi Cys384 a Cys374 disulfidický můstek a axiální ligand hemu Cys384 je nahrazen za jiný neutrální aminokyselinový zbytek. (c) Redukcí iontu železa v hemu na Fe^{2+} dochází k disociaci Cys384, který je posléze nahrazen také jiným neutrálním aminokyselinovým zbytkem, přičemž His568 axiálním ligandem zůstává. (d) Na Fe^{2+} hem je umožněna vazba molekuly CO, která nahrazuje původní Cys384. Převzato a upraveno podle (Gupta and Ragsdale, 2011).

Oba jaderné receptory Rev-erb α i Rev-erb β jsou schopny detekovat přítomnost hemu, jehož navázání vede k regulaci funkce těchto proteinů. Mohli bychom tím pádem oba proteiny zařadit mezi senzory hemu. Ovšem novější studie zaměřená na kinetiku interakce těchto proteinů s hemem ukázala, že rychlost disociace Fe^{3+} hemu z Rev-erb β je tak nízká a hem je vázán příliš pevně, že je nemožné, aby Rev-erb β sloužil jako senzor hemu (Carter et al., 2017). Na afinitu hemu k Rev-erb β má však vliv také oxidační stav iontu železa hemu, a dokonce i oxidační stav Rev-erb β . Při redukci navázaného Fe^{3+} hemu na Fe^{2+} hem dochází k disociaci axiálního ligandu Cys384 nebo k nahrazení Cys384 za jiný neutrální aminokyselinový zbytek (Obrázek 5c) (Marvin et al., 2009). Hem s Fe^{2+} iontem vykazuje několikanásobně nižší afinitu

k LBD doméně Rev-erb β než Fe³⁺ hem (Carter et al., 2017). Za oxidativních podmínek dochází také k tvorbě disulfidického můstku mezi Cys384 a Cys374, jehož vznik vyvolá změny v koordinační struktuře hemu (Obrázek 5b, str. 14). Axiální ligand hemu Cys384 je nahrazen jiným neutrálním aminokyselinovým zbytkem a zároveň dochází i ke snížení afinity hemu k Rev-erb β (Gupta and Ragsdale, 2011). Dokonce redoxní změna vedoucí k vytvoření disulfidického můstku mezi Cys384 a Cys374 vede k disociaci korepresoru NCoR1 z Rev-erb β (Carter et al., 2017). Redoxní stav zásadně ovlivňuje vazbu hemu na Rev-erb β a tím ovlivňuje jeho schopnost regulovat expresi příslušných genů. Ačkoliv bylo navrženo, že Fe³⁺ hem je na Rev-erb β vázán příliš pevně, aby mohl Rev-erb β sloužit jako hemový senzorový protein, mohli bychom místo toho uvažovat o Rev-erb β jako o redoxním senzoru.

Jako tomu bylo i v případě jiných hemových senzorových proteinů, i zde byla zkoumána možnost interakce s molekulou CO. V Rev-erb β byl spektroskopickými metodami CO prokázán jako axiální ligand Fe²⁺ hemu. Vazbou CO dochází k nahrazení Cys384, zatímco His568 jako druhý axiální ligand zůstává (Obrázek 5d, str. 14) (Marvin et al., 2009). Molekula CO má také velmi vysokou afinitu k Fe²⁺ hemu v LBD doméně Rev-erb β ($K_d = 60$ nM). Afinita CO je dokonce mnohem vyšší než v případě iontu železa hemu transkripčního faktoru NPAS2 ($K_d = 1$ μ M) (Dioum et al., 2002), a tak vzniká možnost, že CO by mohl mít roli signální molekuly i v případě jaderného receptoru Rev-erb β . Vliv plynných signálních molekul na represní funkci Rev-erb β prozatím příliš studován nebyl. Pouze jedna studie ukázala, že interakce Rev-erb β s NCoR1 je regulována pomocí NO, zatímco CO má na tuto interakci vliv minimální (Marvin et al., 2009). Doposud objevené skutečnosti nasvědčují tomu, že jaderný receptor Rev-erb β je pravděpodobně redoxním senzorem. Abychom zjistili, zda má na funkci Rev-erb β vliv také oxid uhelnatý, je potřeba provést více studií, které odhalí, jestli Rev-erb β patří i mezi hemové senzory plynu.

4. 5. Membránový komponent progesteronového receptoru 1

Membránový komponent progesteronového receptoru 1 neboli PGRMC1 (z angl. progesterone receptor membrane component 1) je protein z rodiny progesteronových receptorů asociovaných s membránou. Jeho exprese je zvýšená v různých typech nádorových buněk, jako jsou nádory prsu (Neubauer et al., 2013) či plic (Mir et al., 2012). K indukci exprese *pgrmc1* dochází působením karcinogenů, například dioxinem (Selmin et al., 1996).

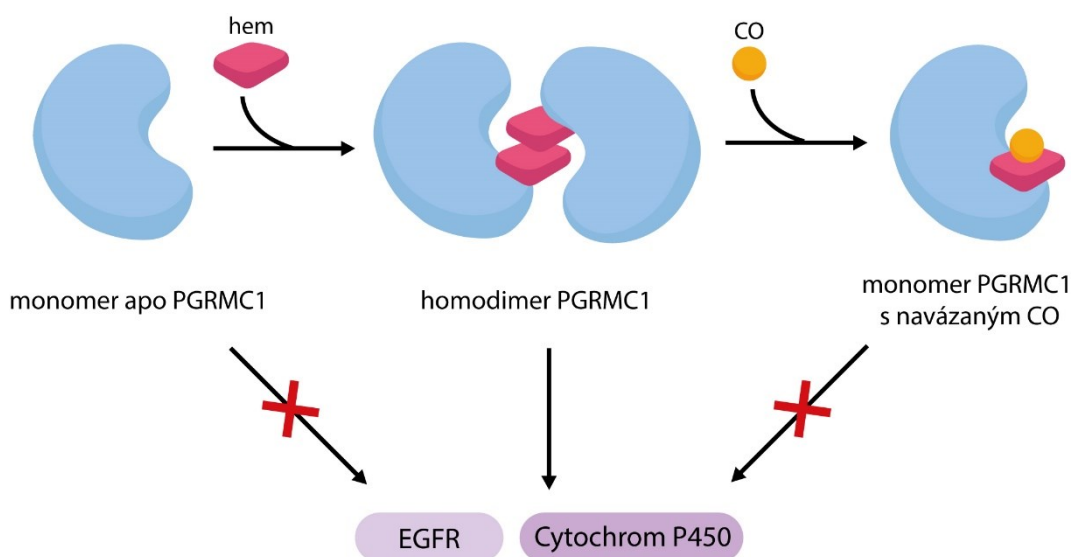
Zvýšená hladina PGRMC1 vede k narušení apoptotické dráhy nádorových buněk (Peluso et al., 2006), k jejich proliferaci (Ahmed et al., 2010a), a PGRMC1 dokonce podporuje přežití buněk po vystavení chemoterapeutickým lékům (Peluso et al., 2008). Regulace růstu a životaschopnosti nádorů je spojena s interakcí PGRMC1 s tyrosin-kinázovým receptorem epidermálního růstového faktoru (EGFR) (Ahmed et al., 2010b) a s různými typy cytochromů P450 (Szczesna-Skorupa and Kemper, 2011).

PGRMC1 obsahuje na svém N-konci transmembránový helix, kterým je ukotven do membrány a na C-konci je doména vázající hem (Ghosh et al., 2005), která je homologická s doménou cytochromu *b₅* (Mifsud and Bateman, 2002). Mezi oběma těmito hemovými doménami se však vyskytují významné odlišnosti. Zatímco v cytochromu *b₅* je Fe^{3+} ion hemu 6-koordinovaný a axiálními ligandy jsou histidiny, v případě PGRMC1 je Fe^{3+} ion hemu 5-koordinovaný a jeho axiálním ligandem je Tyr113 (Kabe et al., 2016). Jelikož je ion železa hemu vázán pouze pěti ligandy, chybějící šestý ligand vytváří volný prostor kolem hemu, který slouží k velmi zajímavé a netypické interakci s hemem druhé molekuly PGRMC1 a umožňuje vytvoření homodimeru. Ve formě homodimeru je PGRMC1 schopný interagovat s výše zmíněným EGFR a regulovat jeho funkci. Naopak pokud PGRMC1 nemá na sebe navázaný hem, zůstává ve formě neaktivního monomeru, který není schopen vazby na EGFR (Kabe et al., 2016). Přítomnost a vazba hemu hraje zásadní roli v regulaci funkce PGRMC1 a jeho vlivu na nádorové buňky skrze EGFR, a můžeme ho tak zařadit mezi senzory hemu.

Nádorové buňky potřebují pro své přežití a proliferaci zvýšený příjem železa (Bauckman et al., 2015; Steegmann-Olmedillas, 2011). Vysoká koncentrace železa v buňkách vede i ke zvýšené biosyntéze hemu (Chen and Paw, 2012). Některé studie ukazují, že vyčerpání železa či hemu z buněk vede k potlačení růstu nádoru (Shen et al., 2014). Dostupný hem je v buňce mimo jiné využit právě pro vazbu na PGRMC1, čímž umožní vznik homodimeru skrze interakci dvou molekul hemu. Homodimer PGRMC1 interaguje s EGFR a cytochromy P450 a způsobí tím zvýšenou proliferaci a chemorezistenci nádorových buněk (Obrázek 6, str. 17) (Kabe et al., 2016).

Pokud je Fe^{3+} ion v hemu PGRMC1 redukován pomocí $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ na Fe^{2+} a je následně přidán CO, dochází k disociaci homodimeru na dva monomery PGRMC1, které nejsou schopny vázat se na EGFR (Obrázek 6, str. 17). Molekula CO se váže jako axiální ligand iontu železa hemu a tím naruší interakci dvou hemů a dojde k rozpadnutí homodimeru (Kabe et al., 2016). Fe^{2+} ion hemu je v tomto případě vázán 6 ligandy, z nichž jedním axiálním ligandem je CO a druhým ligandem je pravděpodobně histidin, který nahradil původní Tyr113 (Kaluka et al.,

2015). Navázání CO na Fe^{2+} hem narušuje funkci PGRMC1 a tím dochází k potlačení růstu nádorů a snížení chemorezistence. Toto zjištění je v souladu i s jinými studiemi, které se zaměřovaly na inhibici růstu nádorů vlivem CO (Wegiel et al., 2013) a vlivem zvýšené aktivity enzymu HO-1, jehož produktem je právě CO (Lee et al., 2014).



Obrázek 6: Schéma regulace funkce PGRMC1 navázáním hemu a molekuly CO. PGRMC1 bez navázaného hemu není schopen interakce s EGFR a cytochromy P450. Po navázání hemu dochází skrze interakci s hemem druhé molekuly PGRMC1 k vytvoření homodimeru. V této formě je homodimer schopný vazby na EGFR a cytochromy P450 vedoucí k proliferaci a zvýšené chemorezistenci nádorových buněk. Pokud je na hem navázána molekula CO, dochází k disociaci homodimeru a vzniká opět neaktivní monomer PGRMC1, který EGFR a cytochromy P450 neváže. Převzato a upraveno podle (Kabe et al., 2018).

Molekula CO se však váže pouze na hem s Fe^{2+} iontem, zatímco homodimer PGRMC1 má navázané hemy s Fe^{3+} iontem. Aby mohl být CO na hem navázán, muselo by dojít k redukci železitého iontu. Skupina Shimizu a kol. upozorňuje, že redoxní potenciál PGRMC1 s navázaným Fe^{3+} hemem (-331 mV) (Kaluka et al., 2015) je příliš nízký na to, aby mohl být Fe^{3+} ion hemu redukován za aerobních podmínek na Fe^{2+} . Také zdůrazňují, že struktura, a tím pádem i funkce PGRMC1 s navázaným Fe^{2+} hemem, je odlišná od struktury PGRMC1 s Fe^{3+} hemem a k tomuto pozměnění struktury dochází ještě před samotným přidáním CO (Shimizu et al., 2019). Prozatím není zcela jasné, zda má vůbec CO přímý vliv na funkci PGRMC1 a pokud ano, tak jakým způsobem k této regulaci dochází.

4. 6. Draselné kanály

Navázání hemu či molekuly CO na některé proteiny má zásadní vliv na regulaci mnoha buněčných procesů, například snížení či zvýšení transkripční aktivity, jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách. Další z funkcí, která je regulována vazbou hemu, je proudění iontů skrze některé typy draselných kanálů.

Jedním typem K^+ kanálů, jejichž funkce je ovlivnitelná navázáním hemu, jsou Ca^{2+} -aktivované a napětově řízené Slo1 BK kanály. Název je odvozen od jejich vysoké vodivosti a selektivity pro draselné ionty (BK, z angl. big potassium), a proto se jim také přezdívá maxi K kanály (Magleby, 2003). Slo1 BK kanály hrají důležitou roli například v regulaci uvolňování některých neurotransmiterů (Wang et al., 2001) nebo v regulaci stahů hladké svaloviny cév (Brenner et al., 2000). Funkce těchto kanálů je řízena nejen přítomností Ca^{2+} a depolarizací membrány, ale také vazbou hemu s Fe^{2+} či Fe^{3+} iontem. Oba typy hemu se vážou na Slo1 BK kanál a inhibují jeho funkci tím, že snižují frekvenci otevírání kanálu, což vyústí ve sníženou propustnost pro K^+ ionty. Fe^{3+} hem je na Slo1 BK kanál vázán pomocí strukturního motivu, který obsahuje po sobě jdoucí aminokyseliny Cys-Lys-Ala-Cys-His (CKACH). Strukturní motiv CKACH je umístěn na C konci proteinu mezi dvěma doménami regulujícími vodivost K^+ kanálu (RCK1 a RCK2, z angl. regulator of K^+ conductance). Železitý ion v hemu navázaném na Slo1 BK kanál byl identifikovaný jako 6-koordinovaný a jeho axiálními ligandy by mohly být pravděpodobně Cys615 a His616, které jsou součástí CKACH motivu vázající hem (Tang et al., 2003). Koordinační struktura Fe^{2+} nebyla prozatím blíže studována.

Vliv na propustnost Slo1 BK kanálů pro draselné ionty má také oxid uhelnatý. Ukazuje se však, že způsobů, jak dochází k regulaci funkce kanálů pomocí CO, je více. Jeden ze způsobů regulace funkce Slo1 BK kanálů molekulou CO je zprostředkován interakcí CO s hemem navázaným na kanálu. Jak bylo zmíněno výše, vazba hemu s Fe^{2+} i Fe^{3+} iontem na kanál vede k jeho snížené propustnosti pro K^+ ionty. Pokud se na Fe^{2+} ion hemu naváže molekula CO, dojde ke zrušení tohoto inhibičního efektu a propustnost kanálu pro K^+ ionty se opět zvýší. CO se však váže pouze jen na Fe^{2+} a nikoliv na Fe^{3+} ion železa hemu, proto nebyl pozorován aktivační afekt na kanál s navázaným Fe^{3+} hemem (Jaggar et al., 2005). V blízkém okolí Slo1 BK kanálu se nachází enzym hemoxygenáza 2 (HO-2), která je ke kanálu přidružená a svou aktivitou (tj. produkcí CO) zvyšuje propustnost Slo1 BK kanálu pro draselné ionty. Mutací HO-2 dochází ke snížení aktivity kanálu. Pokud je ovšem do uvedeného systému dodán

CO, který je jinak produktem činnosti HO-2, dochází k nahrazení ztracené funkce enzymu a aktivita kanálu se opět zvýší (Williams et al., 2004).

Druhým způsobem je přímé navázání CO na kanál, které vede ke zvýšené propustnosti pro K^+ ionty. Molekula CO se váže do RCK1 domény na cytoplazmatické straně kanálu skrze interakci s aminokyselinovými zbytky dvou histidinů a kyseliny asparagové (Hou et al., 2008). Tento způsob interakce, při kterém CO interaguje přímo s aminokyselinami, je ojedinělý a doposud nebyl v žádných jiných studiích pozorován. Autoři této studie v podrobné diskuzi tuto skutečnost připouštějí a navrhuji, že zmíněné histidiny by mohly sloužit jako axiální ligandy hemu a interakce CO s kanálem by v tom případě nebyla přímá, ale zprostředkována iontem železa hemu. Na druhou stranu však také upozorňují, že regulace funkce kanálu molekulou CO byla pozorována i za podmínek, při kterých by případný přítomný ion železa byl oxidován na Fe^{3+} a nebyl by tudíž schopný interagovat s CO.

Za normálních podmínek slouží RCK1 doména Slo1 BK kanálu pro vazbu Ca^{2+} iontů, které kanál aktivují (Jiang et al., 2002). Bylo pozorováno, že aktivace kanálu pomocí CO navázáním do RCK1 domény vede k aktivaci kanálu i v nepřítomnosti Ca^{2+} iontů. Naopak pokud je koncentrace vápenatých iontů vysoká, CO přestává mít vliv na aktivaci kanálu. Je tedy možné, že v nepřítomnosti Ca^{2+} iontů zastupuje jejich roli v aktivaci Slo1 BK kanálu právě molekula CO (Hou et al., 2008).

Dalším typem kanálů, u kterých je jejich funkce regulována vazbou hemu, jsou draselné kanály, jejichž aktivita je závislá na intracelulární koncentraci ATP (K_{ATP} kanály). K_{ATP} kanály se nachází v buňkách srdeční svaloviny, kosterní svaloviny i hladké svaloviny cév a jsou zodpovědné za vzrušivost těchto buněk. Proudění draselných iontů těmito kanály je inhibováno přítomností mikromolárních koncentrací ATP (Ashcroft, 1988). Analogicky se situací v případě Slo1 BK kanálů, tak i zde má navázání hemu vliv na propustnost K_{ATP} kanálů pro K^+ ionty. Na rozdíl od Slo1 BK kanálů dochází v případě K_{ATP} kanálů po vazbě hemu ke zvýšení pravděpodobnosti otevření kanálu, a tím pádem ke zvýšení jeho aktivity. Hem s K_{ATP} kanálem interaguje skrze vazebný motiv Cys628-X-X-His631-(X)₁₆-His648, ve kterém by Cys628 a His648 mohly sloužit jako potenciální axiální ligandy iontu železa hemu (Burton et al., 2016).

Na funkci Slo1 BK kanálů má výrazný vliv spolu s hemem i molekula CO, a proto bylo studováno, zda je CO schopný regulovat funkci i K_{ATP} kanálů. CO se váže na K_{ATP} kanál skrze Fe^{2+} ion hemu a jeho navázáním dochází k nahrazení axiálního ligandu Cys628. Navázání CO

vede k aktivaci kanálu, a tím ke zvýšení propustnosti pro draselné ionty. K této aktivaci dochází pouze pokud je na kanálu navázaný hem (Kapetanaki et al., 2018). V tomto případě se tedy neprojevuje vliv CO bez prostřednictví hemu, jak bylo překvapivě pozorováno v případě Slo1 BK kanálů (Hou et al., 2008). Slo1 BK kanály i K_{ATP} kanály jsou schopné navázat hem, který ovlivňuje jejich propustnost pro K^+ ionty, a proto můžeme oba typy kanálů zařadit mezi senzory hemu. Na funkci kanálů má též vliv i navázání molekuly oxidu uhelnatého, tudíž bychom mohli pravděpodobně oba kanály zařadit také i mezi CO senzory.

5. Závěr

Hemové sensorové proteiny tvoří jednu ze skupin hemových proteinů, které je v současné době věnována velká pozornost. Rozvoj nových technologií umožňuje čím dál přesnější a podrobnější studium struktury a funkce těchto proteinů. Nedávné objevy však přinesly myšlenku, že v případě některých z proteinů dochází pravděpodobně k překryvu více funkcí. Hemové sensorové proteiny jsou schopné vázat hem, který ovlivňuje strukturu a tím i funkci proteinu, ale zároveň mohou tyto proteiny skrze hem vázat i malé plynné molekuly, jejichž navázání vede k dalším strukturním a funkčním změnám (Freeman et al., 2019; Kabe et al., 2016; Minegishi et al., 2018). K takovým změnám může docházet i v případě změny redoxního stavu iontu železa obsaženého v hemu (Carter et al., 2017).

Práce byla zaměřená na jednotlivé proteiny z této skupiny a na diskuzi, zda jsou tyto senzory hemu zároveň i senzory oxidu uhelnatého. Zatímco v případě některých proteinů se nashromáždilo mnoho důkazů, které nasvědčují tomu, že jsou tyto hemové senzory pravděpodobně zároveň i CO senzory (Freeman et al., 2019; Kabe et al., 2016; Minegishi et al., 2018), u zbylých proteinů jsou výsledky naopak nejasné či rozporuplné (Carter et al., 2016, 2017; Marvin et al., 2009; Yin et al., 2007). Všechny zmíněné proteiny bude však potřeba ještě dále intenzivně studovat, abychom dopodrobna odhalili mechanismy, kterými jsou funkce těchto proteinů regulovány.

Hem se na protein váže do speciálního vazebného místa a jeho navázání působí strukturní změny, které vyústí ve změnu funkce celého proteinu (Burton et al., 2016; Tang et al., 2003). Pro bližší porozumění regulace funkce pomocí hemu se mnoho studií zaměřilo na určení podrobné koordinační struktury Fe^{2+} a Fe^{3+} hemu v proteinu. Zatímco v případě některých proteinů (např. NPAS2 či Rev-erb β) byly axiální ligandy obou forem hemu jasně identifikovány (Marvin et al., 2009; Pardee et al., 2009; Uchida et al., 2005), u zbylých proteinů zatím není zcela jasné, které aminokyselinové zbytky jsou axiálními ligandy hemu. Zároveň je důležité zdůraznit, že určování koordinační struktury se prozatím týkalo spíše proteinů s navázaným Fe^{3+} hemem a určitě by bylo dobré věnovat také více pozornosti odhalení koordinační struktury Fe^{2+} iontu hemu v těchto proteinech (Lukat-Rodgers et al., 2010; de Rosny et al., 2006). Není to pravidlem, ale při změně oxidačního stavu iontu železa totiž často dochází ke změně axiálních ligandů (Carter et al., 2017). Krom axiálních ligandů je potřeba se zaměřit ještě podrobněji na okolní strukturu vazebného místa pro hem, která může hrát také roli v ovlivňování funkce proteinu (distální vazebné místo).

V případě všech zmiňovaných zástupců hemových senzorů byla objevena schopnost vazby molekuly CO (Jaggar et al., 2005; Kabe et al., 2016; Kapetanaki et al., 2018; Lukat-Rodgers et al., 2010; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005; Uchida et al., 2005). U některých proteinů bylo pozorováno, že navázání CO na hem vede k pozměnění funkce proteinu. Důležitým faktem je, že CO se váže pouze na ionty kovů, tj. v živém organismu typicky na Fe^{2+} ion hemu (Kajimura et al., 2010). Výjimkou jsou Slo1 BK kanály, u kterých byla pozorována přímá interakce CO s aminokyselinami (Hou et al., 2008). Nicméně autoři studie zvažují, že toto ojedinělé pozorování by mohlo být vysvětleno tím, že interakce CO s kanálem není přímá, ale je ve skutečnosti zprostředkována ionty železa. Jelikož se CO váže jen na Fe^{2+} a nikoliv na Fe^{3+} , byl v mnoha studiích použit k redukci železitého iontu hemu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, aby bylo možné pozorovat vliv CO. Avšak to, jakým způsobem a jestli vůbec dochází k redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} v buňkách za přirozených podmínek, nebylo zatím řádně prostudováno. Objevení mechanismu, jakým přirozeně probíhá redukce železitého iontu hemu, by mohlo přinést mnoho odpovědí na doposud neobjasněné otázky a vyřešit problémy, díky kterým nemůžeme jasně určit, zda patří zmiňované proteiny také mezi CO senzory.

I přes to, že bylo této problematice věnováno mnoho studií, je zřejmé, že jsme teprve na začátku a mnoho otázek zůstává stále nezodpovězených. Některé hemové senzorové proteiny se účastní patologických procesů v lidském těle a správné pochopení mechanismů, jakými je regulována jejich funkce, nám může pomoci ve vývoji nových diagnostických a terapeutických postupů. Proto si myslím, že pokračování ve studiu této problematiky bude nejen velmi zajímavé, ale i přínosné.

6. Seznam literatury

- Addison, A.W., and Stephanos, J.J. (1986).** Nitrosyliron(III) hemoglobin: autoreduction and spectroscopy. *Biochemistry* 25, 4104–4113.
- Ahmed, I.S., Rohe, H.J., Twist, K.E., Mattingly, M.N., and Craven, R.J. (2010a).** Progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1): a heme-1 domain protein that promotes tumorigenesis and is inhibited by a small molecule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 564–573.
- Ahmed, I.S., Rohe, H.J., Twist, K.E., and Craven, R.J. (2010b).** Pgrmc1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) Associates with Epidermal Growth Factor Receptor and Regulates Erlotinib Sensitivity. *J. Biol. Chem.* 285, 24775–24782.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001).** Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 81, 1269–1304.
- Ashcroft, F.M. (1988).** Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 11, 97–118.
- Asher, G., and Schibler, U. (2006).** A CLOCK-less clock. *Trends in Cell Biology* 16, 547–549.
- Bain, D.L., Heneghan, A.F., Connaghan-Jones, K.D., and Miura, M.T. (2007).** Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annual Review of Physiology* 69, 201–220.
- Bauckman, K., Haller, E., Taran, N., Rockfield, S., Ruiz-Rivera, A., and Nanjundan, M. (2015).** Iron alters cell survival in a mitochondria-dependent pathway in ovarian cancer cells. *Biochem. J.* 466, 401–413.
- Brenner, R., Pérez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, S.W., Patterson, A.J., Nelson, M.T., and Aldrich, R.W. (2000).** Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870–876.
- Burton, M.J., Kapetanaki, S.M., Chernova, T., Jamieson, A.G., Dorlet, P., Santolini, J., Moody, P.C.E., Mitcheson, J.S., Davies, N.W., Schmid, R., et al. (2016).** A heme-binding domain controls regulation of ATP-dependent potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 3785–3790.
- Buszczak, M., Freeman, M.R., Carlson, J.R., Bender, M., Cooley, L., and Segraves, W.A. (1999).** Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* 126, 4581–4589.
- Carter, E.L., Gupta, N., and Ragsdale, S.W. (2016).** High Affinity Heme Binding to a Heme Regulatory Motif on the Nuclear Receptor Rev-erb β Leads to Its Degradation and Indirectly Regulates Its Interaction with Nuclear Receptor Corepressor. *J. Biol. Chem.* 291, 2196–2222.
- Carter, E.L., Ramirez, Y., and Ragsdale, S.W. (2017).** The heme-regulatory motif of nuclear receptor Rev-erb β is a key mediator of heme and redox signaling in circadian rhythm maintenance and metabolism. *J. Biol. Chem.* 292, 11280–11299.
- Chen, C., and Paw, B.H. (2012).** Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1459–1467.

- Correa-Costa, M., Gallo, D., Csizmadia, E., Gomperts, E., Lieberum, J.-L., Hauser, C.J., Ji, X., Wang, B., Câmara, N.O.S., Robson, S.C., et al. (2018). Carbon monoxide protects the kidney through the central circadian clock and CD39. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E2302–E2310.
- Dioum, E.M., Rutter, J., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.-A., and McKnight, S.L. (2002). NPAS2: A Gas-Responsive Transcription Factor. *Science* 298, 2385–2387.
- Doi, M., Hirayama, J., and Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* 125, 497–508.
- Freeman, S.L., Kwon, H., Portolano, N., Parkin, G., Girija, U.V., Basran, J., Fielding, A.J., Fairall, L., Svistunenko, D.A., Moody, P.C.E., et al. (2019). Heme binding to human CLOCK affects interactions with the E-box. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 19911–19916.
- Fukuto, J.M., Carrington, S.J., Tantillo, D.J., Harrison, J.G., Ignarro, L.J., Freeman, B.A., Chen, A., and Wink, D.A. (2012). Small Molecule Signaling Agents: The Integrated Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Oxides, Oxides of Carbon, Dioxygen, Hydrogen Sulfide, and Their Derived Species. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 769–793.
- Ghosh, K., Thompson, A.M., Oh, E., Shi, X., Goldbeck, R.A., Zhiwu, Z., Vulpe, C., and Holman, T.R. (2005). Spectroscopic and Biochemical Characterization of Heme Binding to Yeast Dap1p and Mouse PGRMC1p. *Biochemistry* 44, 16729–16736.
- Gupta, N., and Ragsdale, S.W. (2011). Thiol-disulfide redox dependence of heme binding and heme ligand switching in nuclear hormone receptor rev-erb β . *J. Biol. Chem.* 286, 4392–4403.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 150–166.
- Hou, S., Xu, R., Heinemann, S.H., and Hoshi, T. (2008). The RCK1 high-affinity Ca²⁺ sensor confers carbon monoxide sensitivity to Slo1 BK channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4039–4043.
- Ishida, M., Ueha, T., and Sagami, I. (2008). Effects of mutations in the heme domain on the transcriptional activity and DNA-binding activity of NPAS2. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 368, 292–297.
- Jaggar, J.H., Li, A., Parfenova, H., Liu, J., Umstot, E.S., Dopico, A.M., and Leffler, C.W. (2005). Heme Is a Carbon Monoxide Receptor for Large-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *Circ. Res.* 97, 805–812.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417, 515–522.
- Kabe, Y., Nakane, T., Koike, I., Yamamoto, T., Sugiura, Y., Harada, E., Sugase, K., Shimamura, T., Ohmura, M., Muraoka, K., et al. (2016). Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nat Commun* 7.
- Kabe, Y., Handa, H., and Suematsu, M. (2018). Function and structural regulation of the carbon monoxide (CO)-responsive membrane protein PGRMC1. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 63, 12–17.
- Kajimura, M., Fukuda, R., Bateman, R.M., Yamamoto, T., and Suematsu, M. (2010). Interactions of Multiple Gas-Transducing Systems: Hallmarks and Uncertainties of CO, NO, and H₂S Gas Biology. *Antioxid. Redox. Signal.* 13, 157–192.
- Kaluka, D., Batabyal, D., Chiang, B.-Y., Poulos, T.L., and Yeh, S.-R. (2015). Spectroscopic and Mutagenesis Studies of Human PGRMC1. *Biochemistry* 54, 1638–1647.

Kapetanaki, S.M., Burton, M.J., Basran, J., Uragami, C., Moody, P.C.E., Mitcheson, J.S., Schmid, R., Davies, N.W., Dorlet, P., Vos, M.H., et al. (2018). A mechanism for CO regulation of ion channels. *Nat. Commun.* 9, 907.

King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D.L., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., et al. (1997). Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock Gene. *Cell* 89, 641–653.

Lee, W.-Y., Chen, Y.-C., Shih, C.-M., Lin, C.-M., Cheng, C.-H., Chen, K.-C., and Lin, C.-W. (2014). The induction of heme oxygenase-1 suppresses heat shock protein 90 and the proliferation of human breast cancer cells through its byproduct carbon monoxide. *Toxicol. and Applied Pharmacol.* 274, 55–62.

Lukat-Rodgers, G.S., Correia, C., Botuyan, M.V., Mer, G., and Rodgers, K.R. (2010). Heme-based Sensing by the Mammalian Circadian Protein, CLOCK. *Inorg. Chem.* 49, 6349–6365.

Magleby, K.L. (2003). Gating Mechanism of BK (Slo1) Channels. *J. Gen. Physiol.* 121, 81–96.

Marvin, K.A., Reinking, J.L., Lee, A.J., Pardee, K.M., Krause, H.M., and Burstyn, J.N. (2009). Nuclear receptors Homo sapiens Rev-erb β and Drosophila melanogaster E75 are thiolate-ligated heme proteins, which undergo redox-mediated ligand switching and bind CO and NO. *Biochemistry* 48, 7056–7071.

Mifsud, W., and Bateman, A. (2002). Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol.* 3, research0068.1-research0068.5.

Minegishi, S., Sagami, I., Negi, S., Kano, K., and Kitagishi, H. (2018). Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide. *Sci. Rep.* 8, 11996.

Mir, S.U.R., Ahmed, I.S.A., Arnold, S., and Craven, R.J. (2012). Elevated progesterone receptor membrane component 1/sigma-2 receptor levels in lung tumors and plasma from lung cancer patients. *Int. Journal of Cancer* 131, E1–E9.

Mukaiyama, Y., Uchida, T., Sato, E., Sasaki, A., Sato, Y., Igarashi, J., Kurokawa, H., Sagami, I., Kitagawa, T., and Shimizu, T. (2006). Spectroscopic and DNA-binding characterization of the isolated heme-bound basic helix–loop–helix-PAS-A domain of neuronal PAS protein 2 (NPAS2), a transcription activator protein associated with circadian rhythms. *The FEBS Journal* 273, 2528–2539.

Neubauer, H., Ma, Q., Zhou, J., Yu, Q., Ruan, X., Seeger, H., Fehm, T., and Mueck, A.O. (2013). Possible role of PGRMC1 in breast cancer development. *Climacteric* 16, 509–513.

Pardee, K.I., Xu, X., Reinking, J., Schuetz, A., Dong, A., Liu, S., Zhang, R., Tiefenbach, J., Lajoie, G., Plotnikov, A.N., et al. (2009). The structural basis of gas-responsive transcription by the human nuclear hormone receptor REV-ERB β . *PLoS Biol.* 7, e43.

Peluso, J.J., Pappalardo, A., Losel, R., and Wehling, M. (2006). Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology* 147, 3133–3140.

Peluso, J.J., Liu, X., Saunders, M.M., Claffey, K.P., and Phoenix, K. (2008). Regulation of ovarian cancer cell viability and sensitivity to cisplatin by progesterone receptor membrane component-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1592–1599.

Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell* 110, 251–260.

Raghuram, S., Stayrook, K.R., Huang, P., Rogers, P.M., Nosie, A.K., McClure, D.B., Burris, L.L., Khorasanizadeh, S., Burris, T.P., and Rastinejad, F. (2007). Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1207–1213.

Reinking, J., Lam, M.M.S., Pardee, K., Sampson, H.M., Liu, S., Yang, P., Williams, S., White, W., Lajoie, G., Edwards, A., et al. (2005). The *Drosophila* nuclear receptor e75 contains heme and is gas responsive. *Cell* 122, 195–207.

Renaud, J.P., Harris, J.M., Downes, M., Burke, L.J., and Muscat, G.E. (2000). Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. *Mol. Endocrinol.* 14, 700–717.

Rochette, L., Cottin, Y., Zeller, M., and Vergely, C. (2013). Carbon monoxide: Mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol. & Therap.* 137, 133–152.

de Rosny, E., de Groot, A., Jullian-Binard, C., Gaillard, J., Borel, F., Pebay-Peyroula, E., Fontecilla-Camps, J.C., and Jouve, H.M. (2006). *Drosophila* nuclear receptor E75 is a thiolate hemoprotein. *Biochemistry* 45, 9727–9734.

Schallner, N., Lieberum, J.-L., Gallo, D., LeBlanc, R.H., Fuller, P.M., Hanafy, K.A., and Otterbein, L.E. (2017). Carbon Monoxide Preserves Circadian Rhythm to Reduce the Severity of Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Stroke* 48, 2565–2573.

Segraves, W.A., and Hogness, D.S. (1990). The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.* 4, 204–219.

Selmin, O., Lucier, G.W., Clark, G.C., Tritscher, A.M., Heuvel, J.P.V., Gastel, J.A., Walker, N.J., R-Sutter, T., and Bell, D.A. (1996). Isolation and characterization of a novel gene induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Carcinogenesis* 17, 2609–2615.

Shen, J., Sheng, X., Chang, Z., Wu, Q., Wang, S., Xuan, Z., Li, D., Wu, Y., Shang, Y., Kong, X., et al. (2014). Iron Metabolism Regulates p53 Signaling through Direct Heme-p53 Interaction and Modulation of p53 Localization, Stability, and Function. *Cell Rep.* 7, 180–193.

Sher, E.A., Shaklai, M., and Shaklai, N. (2012). Carbon monoxide promotes respiratory hemoproteins iron reduction using peroxides as electron donors. *PLoS ONE* 7, e33039.

Shimizu, T., Lengalova, A., Martinek, V., and Martínková, M. (2019). Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chem. Soc. Rev.* 48, 5624–5657.

Steegmann-Olmedillas, J.L. (2011). The role of iron in tumour cell proliferation. *Clin. Transl. Oncol.* 13, 71–76.

Szczesna-Skorupa, E., and Kemper, B. (2011). Progesterone Receptor Membrane Component 1 Inhibits the Activity of Drug-Metabolizing Cytochromes P450 and Binds to Cytochrome P450 Reductase. *Mol. Pharmacol.* 79, 340–350.

Tang, X.D., Xu, R., Reynolds, M.F., Garcia, M.L., Heinemann, S.H., and Hoshi, T. (2003). Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature* 425, 531–535.

Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1969). Microsomal Heme Oxygenase Characterization of the Enzyme. *J. Biol. Chem.* 244, 6388–6394.

Uchida, T., Sato, E., Sato, A., Sagami, I., Shimizu, T., and Kitagawa, T. (2005). CO-dependent Activity-controlling Mechanism of Heme-containing CO-sensor Protein, Neuronal PAS Domain Protein 2. *J. Biol. Chem.* 280, 21358–21368.

Wang, Z.W., Saifee, O., Nonet, M.L., and Salkoff, L. (2001). SLO-1 potassium channels control quantal content of neurotransmitter release at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Neuron* 32, 867–881.

White, K.P., Hurban, P., Watanabe, T., and Hogness, D.S. (1997). Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science* 276, 114–117.

Williams, S.E.J., Wootton, P., Mason, H.S., Bould, J., Iles, D.E., Riccardi, D., Peers, C., and Kemp, P.J. (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 306, 2093–2097.

Yin, L., Wu, N., Curtin, J.C., Qatanani, M., Szwegold, N.R., Reid, R.A., Waitt, G.M., Parks, D.J., Pearce, K.H., Wisely, G.B., et al. (2007). Rev-erb α , a Heme Sensor That Coordinates Metabolic and Circadian Pathways. *Science* 318, 1786–1789.

Zamir, I., Zhang, J., and Lazar, M.A. (1997). Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* 11, 835–846.

Zhou, Y.-D., Barnard, M., Tian, H., Li, X., Ring, H.Z., Francke, U., Shelton, J., Richardson, J., Russell, D.W., and McKnight, S.L. (1997). Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 94, 713–718.